云 南 植 物 研 究 2007，29 (2)：223～230
Acta Botanica Yunnanica

番茄多胁迫诱导型 *LeMTshsp* 启动子的分子克隆及其功能分析*

伊淑莹，孙爱清，赵春梅，刘 箭**
(山东师范大学生命科学学院，山东 济南 250014)

摘要：根据 Southern 杂交结果，选取 *Kpn* Ⅰ 与 *Eco*R Ⅰ 双酶切番茄中蔬 4 号基因组 DNA，3 kb 左右的酶切片段连入 pBSⅡKS（+）载体，构建成含有线粒体小分子热激蛋白基因（*LeMTshsp*）上游 2 kb 左右调控区的质粒文库。通过巢式 PCR 方法从构建的质粒文库中克隆出 *LeMTshsp* 基因上游 1915 bp 的调控区（GenBank 登录号为 AB239774）。该序列含有 TATA box 及 CAAT box 等启动子基本元件，还具有 6 组典型的 HSE 元件及多个 AT-rich 区，另外还有许多逆境反应元件如 ABRE，C-repeat_DRE，AP-1。凝胶阻滞结果表明，纯化的 HsfA2 蛋白与 *LeMTshsp* 启动子的 HSE 元件在体外具有结合活性，且与近端 5 组 HSE 的结合活性比与远端 HSE 的结合活性强。构建该启动子与 GUS 基因的融合载体，利用农杆菌介导的叶圆盘法转化番茄，GUS 组织化学染色结果表明 *LeMTshsp* 启动子对热激、低温、外源 ABA 及重金属胁迫都有应答。

关键词：番茄；线粒体小分子热激蛋白；启动子；逆境；克隆

中图分类号：Q 78，Q 943 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2700 (2007) 02-223-08

Cloning and Functional Analysis of a Multiple Stress-inducible *LeMTshsp* Promoter from Tomato (*Lycopersicon esculentum*)

YI Shu-Ying，SUN Ai-Qing，ZHAO Chun-Mei，LIU Jian**
(*College of Life Sciences*，*Shandong Normal University*，Jinan 250014，China)

Abstract: Based on the Southern blot analysis results，the *Kpn* Ⅰ and *Eco*R Ⅰ restriction enzymes were selected to digest the genomic DNA of a cultivar of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. CV. zhongshu 4). The 3 kb bands of the digested genomic DNA were inserted into the pBSⅡKS (+) vector. As a result，a plasmid library was generated containing about 2 kb of the 5′-flanking sequence of the mitochondria-localized small heat shock protein gene (*LeMTshsp*). A 1915 bp of the 5′-flanking region of *LeMTshsp* was isolated from the plasmid library by nested PCR (GenBank accession number AB239774). The 5′-flanking region of *LeMTshsp* contains putative TATA box，CAAT box，a total of six HSEs and several AT-rich regions. Additionally，there are some transcription factor binding motifs related to stress response，such as ABA-responsive element [ABRE]，C-repeat_DRE and activating protein binding sites [AP-1]. Electrophoresis mobility shift assay (EMSA) showed that the purified HsfA2 protein bound specifically to HSEs of the *LeMTshsp* promoter *in vitro*，and bound strongly to the proximal five HSEs than to the distal HSE. The fusion construction of *LeMTshsp* promoter-*gus* (β-glucuronidase) was introduced into tomato using an *Agrobacterium*-mediated transformation. The resistant transgenic plants were selected on the MS medium containing 50 mg/L kanamicin. PCR analysis showed that the chimeric gus gene was integrated into the tomato genome. By using the gus reporter gene system，the *LeMTshsp* promoter dynamics was explored under stress conditions. After heat，cold，exogenous ABA and heavy metal (Cd^{2+}，Cu^{2+}，Pb^{2+} or Zn^{2+}) treatments，GUS staining was detected in the leaves and roots of transgenic tomato plants. The activity of the *LeMTshsp* promoter under heat shock conditions was comparable to that of the constitutive *CaMV*35*S* promoter. All these results show that the *LeMTshsp*

* 基金项目：国家自然科学基金项目 (30270132)
** 通讯作者：Author for correspondence；E-mail：ljlsd@beelink.com
收稿日期：2006-05-15，2006-10-16 接受发表
作者简介：伊淑莹 (1979-)，女，博士研究生，主要从事分子生物学研究。

promoter is a promoter responding to heat, cold, exogenous ABA and heavy metals.

Key words: Tomato; Mitochondria-localized *shsp*; Promoter; Stress; Clone

冷害、高温和干旱是常见的农业自然灾害，农业生产上抵抗自然灾害的方法很多，其中运用生物技术，特别是基因工程方法培育抗性品种是重要的生物学途径。利用基因工程进行抗性育种，就是将抗性基因导入作物中，提高其抗逆能力。目前基因工程常用的启动子主要是组成型表达启动子，如花椰菜花叶病毒35S（*CaMV*35*S*）启动子、水稻肌动蛋白基因（*Act*1）启动子、玉米泛素基因（*Ubi*1）启动子等。利用组成型表达启动子表达抗性基因虽然可以提高植物在逆境条件下的抗逆能力，但在这些启动子调控下的外源基因在转基因植物的所有部位和发育阶段均表达（Huang等，2001；李一琨和王金发，1998），正常环境下细胞内组成型表达的抗逆蛋白是一种能量的浪费，可能妨碍植物的正常代谢，造成转基因植物的发育异常（Kasuga等，1999）。解决此矛盾的途径就是使用逆境胁迫诱导型启动子，用这些环境胁迫诱导型启动子与抗逆基因融合，使植物在受到逆境胁迫时才表达相应蛋白，从而使转基因植物更好地适应逆境（Kasuga等，1999）。

热激蛋白（heat shock protein，HSP）是生物体在不利环境因素刺激下应激合成的具备分子伴侣活性的一类蛋白质。植物热激蛋白中最丰富的是小分子量热激蛋白（sHSP），分子量一般是15～50 kD。番茄线粒体小分子热激蛋白（mitochondria-localized sHSP，简称LeMTsHSP）由核基因编码，定位于线粒体基质中。番茄LeMTsHSP基因（即*LeMTshsp*）无组成型表达，但对热激（Liu and Shono，2001；Sabehat等，1996）、冷害（Liu and Shono，2001）均有较强应答。作者从番茄中克隆了线粒体小分子热激蛋白基因启动子，构建了含*LeMTshsp*::GUS融合基因的植物表达载体，并转化番茄，通过检测逆境条件下该启动子的诱导活性，发现该启动子对热激、低温、外源ABA及重金属胁迫都有应答。

1 材料与方法

1.1 Southern杂交分析

以番茄（*Lycopersicon esculentum* Mill.）“中蔬4号”成熟叶片为实验材料提取基因组DNA（Dellaporta等，1983），用位于*LeMTshsp* cDNA下游的单一酶切位点*Eco*RⅠ与*Bam*HⅠ、*Bgl*Ⅱ、*Kpn*Ⅰ、*Pst*Ⅰ、*Sac*Ⅰ、*Spe*Ⅰ、*Xba*Ⅰ、*Xho*Ⅰ分别双酶切番茄基因组DNA，另外以*Eco*RⅠ与*Hin*dⅢ单酶切基因组DNA作为对照。以*LeMTshsp*基因片段为探针模板，用α-^{32}P-dCTP标记探针，65℃杂交过夜（杂交液组成为：0.5 mol/L磷酸缓冲液，7% SDS，10 mmol/L EDTA，100 μg/mL鲑精DNA），依次用65℃的4×SSC/0.1% SDS、2×SSC/0.1% SDS和1×SSC/0.1% SDS洗膜，每次10～15 min，X光片曝光。

1.2 质粒文库的构建及启动子片段的获得

*Kpn*Ⅰ与*Eco*RⅠ双酶切的基因组DNA片段经低熔点琼脂糖凝胶电泳分离后，切下3 kb左右的片段并回收，与同样双酶切的pBSⅡKS（+）载体连接，转化大肠杆菌DH5α，复苏后摇菌，提取质粒，以*LeMTshsp* cDNA内部特异引物（正向引物：5′-CATGATGGATCAAATGATGG-3′及反向引物：5′-TCCACAACAACCTATCTAAG-3′）进行PCR检测，证明目的基因确已插入，从而建成含有*LeMTshsp*上游2 kb左右调控区的质粒文库。根据pBSⅡKS（+）载体及已知的*LeMTshsp* cDNA序列设计两组引物进行巢式PCR。首先用pBSⅡKS（+）载体特异引物M13 RV（5′-CAGGAAACAGCTATGAC-3′）与*LeMTshsp*基因特异引物MT R1（5′-TCCACAACAACCTATCTAAG-3′）PCR扩增质粒文库；PCR产物稀释1000倍作为模板，以内部另一对引物T3（5′-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3′）与M1（5′-CTGGTCATAAGCTGTCATCTG-3′）做二次PCR。将得到的大约2 kb的巢式PCR产物连入pGEM-T载体中，测序，从而克隆出*LeMTshsp*上游5′侧翼序列。

1.3 凝胶阻滞分析

番茄全长HsfA2 cDNA构建入pET-27b（+）载体的*Hin*dⅢ/*Xho*Ⅰ位点，*E. coli* BL21菌株表达HsfA2-His6融合蛋白，表达的融合蛋白大量存在于包涵体中，用超声处理及PBS缓冲液多次洗涤的方法纯化包涵体蛋白。最后用结合缓冲液（10 mmol/L Tris，pH 7.9；50 mmol/L NaCl；1 mmol/L EDTA；0.5 mmol/L DTT；5%甘油）溶解包涵体，用于凝胶阻滞分析。

PCR扩增含有HSE1-5的163 bp的*LeMTshsp*启动子片段（起始密码子ATG上游-88至-250）和含有HSE6的152 bp的启动子片段（起始密码子ATG上游-832至-983），引物分别为：HSE1-5/F（5′-CAGAAGCTTTATGTATATTGTCTAC-3′）、HSE1-5/R（5′-TGGAAGCTTAGAATGTGATGCTTGG-3′）和HSE6/F（5′-TGAAGCTTCCAGGTCTCATTCTTG-3′）、HSE6/R（5′-CTGAAGCTTCTAGTCATATCACG-3′）。扩增片段*Hin*dⅢ酶切

后，通过 Taq DNA 聚合酶 72℃延伸 20 min 进行 3′末端 α-^{32}P dCTP 标记。

参照 Mosser 等（1988）的方法，结合缓冲液中包含 5 μg 或 10 μg 纯化的 HsfA2 蛋白与 0.5 ng 末端标记的 HSE1-5 启动子片段或 HSE6 启动子片段，通过在正常的结合反应体系中加入 100 倍过量（50 ng）的未标记寡核苷酸片段来检测结合反应的特异性。室温（26℃）结合 1 h。结合产物于 5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳，以 0.5× TBE 作为电泳缓冲液。

1.4　*LeMTshsp*：：GUS 表达载体的构建及番茄的遗传转化

以所克隆的 *LeMTshsp* 启动子为模板，PCR 扩增该启动子的 1.9 kb 的 DNA 片段（引物为 5′-ATT<u>GTCGAC</u>AAT-TAACCCTCACTAAAGGG-3′和 5′-AGA<u>GGATCC</u>AATAACTT-GCCGATTGAG-3′），扩增产物经 *Sal* Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切后，连入 pBI101 植物表达载体，从而构建成含 *LeMTshsp*：：GUS 融合基因的植物表达载体，使 GUS 基因在 *LeMTshsp* 启动子的驱动下表达。利用冻融法将构建的植物表达载体转化农杆菌 LBA4404，叶圆盘法转化“中蔬 4 号”番茄（Holsters 等，1978），获得的转基因番茄幼苗移至田间育种。同时，将 pBI121 植物表达载体转化番茄作为阳性对照。

1.5　转基因植株的分子鉴定

提取转基因番茄叶片基因组 DNA，利用 GUS 基因特异引物 5′-TCGATAACGTGCTGATGGTGC-3′和 5′-AC-CGAAGTTCATGCCAGTCCAG-3′PCR 扩增 864 bp 的片段。

1.6　转基因番茄的胁迫处理

转基因番茄 T1 代幼苗经卡那霉素筛选后于 26℃温室中培养至五叶期，用于各种逆境处理。热激及冷处理：幼苗暴露于恒温培养箱中 39℃热激处理 3 h 或 2℃低温处理 48 h 后，取其根及叶片用于 GUS 染色；ABA 及重金属处理：取等位叶浸没在 0.10 mmol/L 的 ABA 或 0.20 mmol/L的 $CdCl_2$，$CuSO_4$，Pb（$CH_3COO)_2$，$ZnSO_4$ 中 26℃处理 6 h 后用于 GUS 染色。幼苗经同等浓度的 ABA 及 Pb($CH_3COO)_2$ 浇灌一周后取其根用于 GUS 染色。

1.7　GUS 组织化学染色分析

GUS 组织化学染色方法参照 Jefferson 等（1987）。将转基因番茄的叶片或幼根放入盛有 X-Gluc 反应液（50 mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH 7.0；0.5 mmol/L K_3［Fe $(CN)_6$］；0.5 mmol/L K_4［Fe $(CN)_6$］. $3H_2O$；10 mmol/L EDTA；0.1% Triton X-100；2 mmol/L X-gluc）的 1.5 ml 离心管中，抽真空，37℃染色 16 h。组织用 70% 乙醇脱色，然后观察拍照。

2　结果与分析

2.1　*LeMTshsp* 上游调控序列的酶切位点分析

*Eco*R Ⅰ 是位于番茄 *LeMTshsp* cDNA 下游的单一酶切位点。为获得适合于构建质粒文库的酶切片段，*Eco*R Ⅰ 与能克隆入 pBSⅡKS（+）的 8 种酶分别双酶切番茄基因组 DNA，进行 Southern 杂交。杂交结果显示：*Kpn* Ⅰ 与 *Eco*R Ⅰ 双酶切的基因组 DNA 的杂交片段约 3 kb，包括 2 kb 左右的上游调控序列，适合于构建质粒文库（图 1，泳道 4）。另外，*Hin*dⅢ 单酶切基因组的杂交片段大小与 *LeMTshsp* cDNA 不一致（图 1，泳道 10），设计引物扩增基因组后测序，发现在 *LeMTshsp* 基因序列 ATG 后 201 bp 存在 245 bp 的内含子（结果未显示）。

2.2　*LeMTshsp* 启动子的克隆及序列分析

通过巢式 PCR 方法从质粒文库中克隆出 *LeMTshsp* 上游 5′侧翼区，该片段包括起始密码子 ATG 上

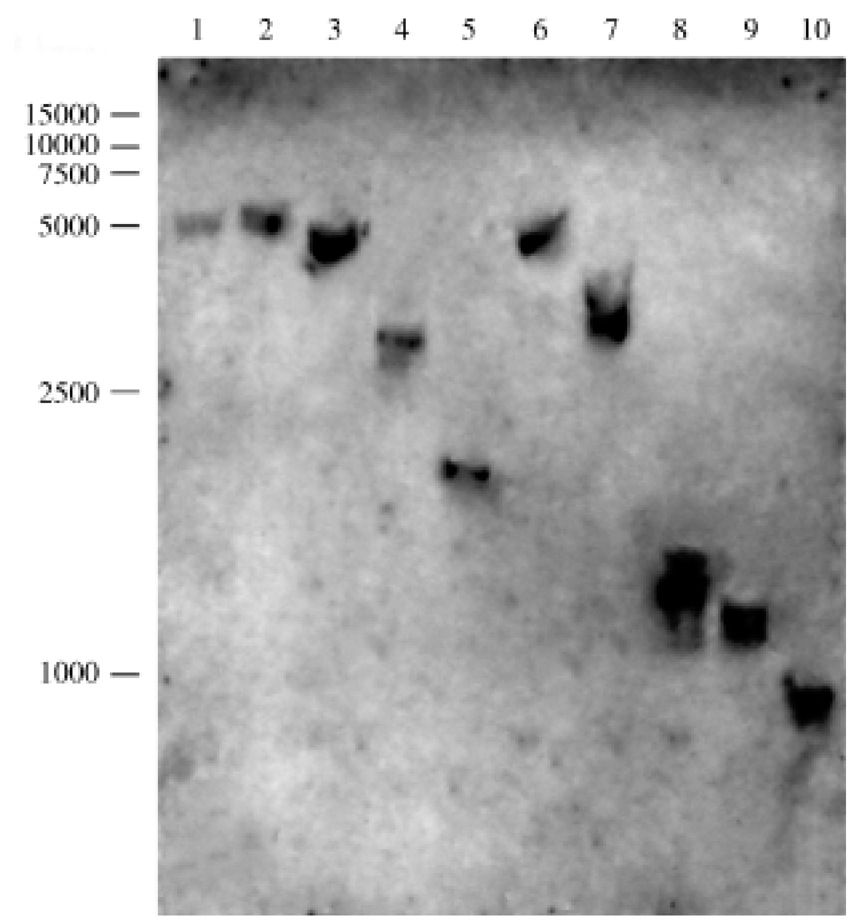


图 1　Southern 杂交结果

10 μg 基因组 DNA 由 *Eco*R Ⅰ，*Hin*dⅢ完全酶切或由 *Eco*R Ⅰ 与不同的酶双酶切。1．*Eco*R Ⅰ；2．*Bam*H Ⅰ/*Eco*R Ⅰ；3．*Bgl* Ⅱ/*Eco*R Ⅰ；4．*Kpn* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ；5．*Pst* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ；6．*Sac* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ；7．*Spe* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ；8．*Xba* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ；9．*Xho* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ；10．*Hin*dⅢ。图左侧数字代表 DL15000 DNA marker。

Fig．1　The result of Southern hybridization

The genomic DNA（10 μg）was digested with *Eco*R Ⅰ，*Hin*d Ⅲ，or double digested with *Eco*R Ⅰ and various restriction enzymes．1．*Eco*R Ⅰ；2．*Bam*H Ⅰ/*Eco*R Ⅰ；3．*Bgl* Ⅱ/*Eco*R Ⅰ；4．*Kpn* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ；5．*Pst* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ；6．*Sac* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ；7．*Spe* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ；8．*Xba* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ；9．*Xho* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ；10．*Hin*dⅢ．The left numbers represent DL15000 DNA marker．

游 1915 bp。在 PlantCARE (http://sphinx.rug.ac.be:8080/PlantCARE)及 TRANSFAC 数据库中分析所分离的 *LeMTshsp* 启动子序列，其中包括许多转录因子结合的顺式调控序列 (图 2)。保守的 TATA box (TATAAA) 位于起始密码子 ATG 上游 -111 bp，CAAT box 位于 -418 bp。TATA box 近端的 5 个 AT-rich (93%) 区分别位于 -301、-356、-435、-497 及 -591 bp。另外两个远端 AT-rich (92%) 区位于 -1600 bp 附近。*LeMTshsp* 启动子区包括 6 个 HSEs，其核心序列为 5′-nGAAn-3′ (Amin 等，1988)。最近端的 HSE1 (TTTCTCGAGTCTTTTTTTCCCCTTCT) 位于 -154 bp。HSE2 (TGATGCTTCT)、HSE3 (ATTCTGGAACATTCT)、HSE4 (CTTCACGCAT) 及 HSE5 (CTTCTAGAAG) 位于 -222 bp 至 -160 bp。另外还发现远端的 HSE6 (CTTCATGAAT) 位于 -888 bp。*LeMTshsp* 启动子区除了 HSEs 外还有许多与胁迫相关的元件，如 ABA 反应元件 ABRE，冷反应元件 C-repeat_DRE，activating protein 1 (AP-1)。该启动子的 GenBank 登录号为 AB239774。



图 2 番茄 *LeMTshsp* 启动子序列分析

推测的 TATA 盒、CAAT 盒以带有下划线的斜体字母表示，推测的顺式作用元件 HSE、AP-1、ABRE、C-repeat_DRE 以下划线标注。HSE 核心元件 GAA/TTC 以矩形框标注，保守的 AT-rich 区以斜体的黑体表示。起始密码子 ATG 以黑体表示。

Fig. 2 Sequence analysis of *LeMTshsp* promoter in tomato

The putative TATA box and CAAT box are shown in italic letters with underlining. Putative transcriptional cis sequences (HSE, activating protein 1 [AP-1], ABA-responsive element [ABRE], C-repeat_DRE) are indicated with underlining. Rectangular frames designate matches to the core consensus GAA/TTC. The putative AT-rich regions are shown in italic and bold letters, and the ATG start codon is shown in bold letters.

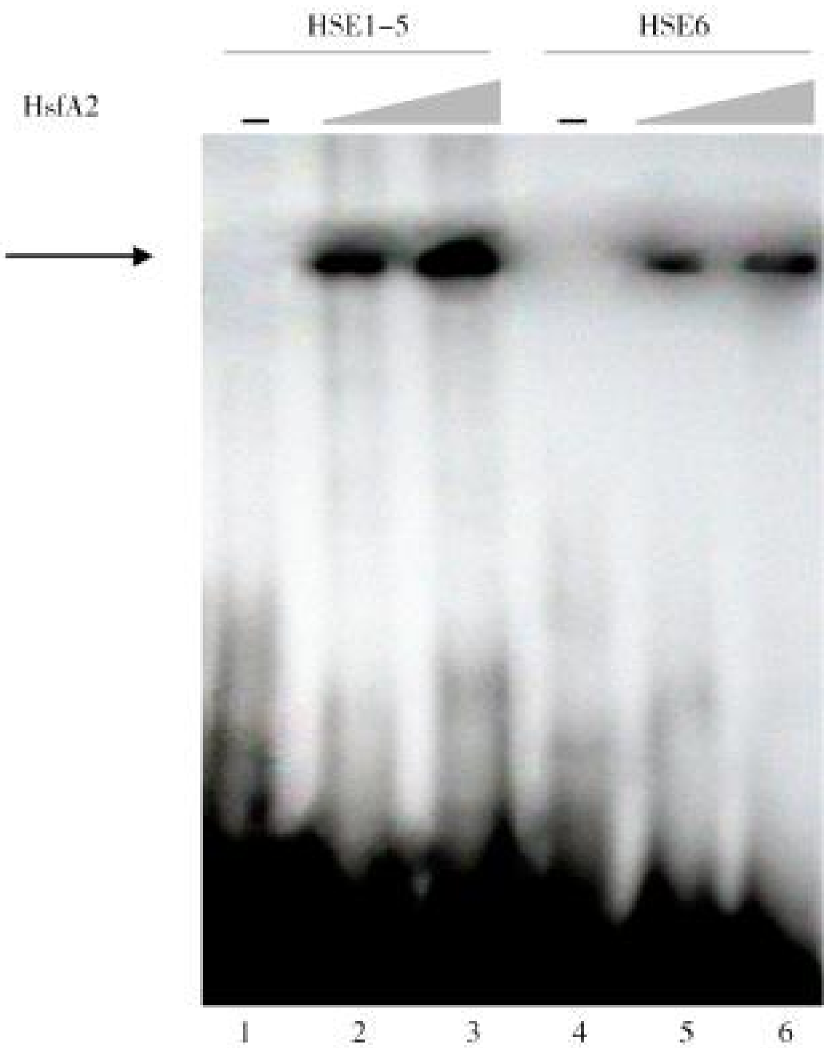


图 3　凝胶阻滞分析结果

标记的 *LeMTshsp* 启动子的 HSE 片段（0.5 ng 的 HSE1-5 启动子片段或 HSE6 启动子片段）与不同浓度的 HsfA2 蛋白（5 μg 或 10 μg）温浴，特异性的竞争物使用 100 倍过量（50 ng）的未标记启动子片段 HSE1-5 或 HSE6（泳道 1 和 4）。2，3．标记的 HSE1-5 启动子片段与 5 μg 或 10 μg 纯化的 HsfA2 蛋白反应；5，6．标记的 HSE6 启动子片段与 5 μg 或 10 μg 纯化的 HsfA2 蛋白反应。箭头所指为文中所述的 HsfA2：：DNA 复合物。

Fig．3　The result of electrophoresis mobility shift assay

Labeled HSE fragments（0.5 ng of promoter fragment HSE1-5 or HSE6）of the *LeMTshsp* promoter were incubated with increasing amounts of the purified HsfA2（5 μg and 10 μg）．As a specific competitor（in Lane 1 and 4），a 100-fold excess（50 ng）of unlabeled promoter fragment HSE1-5 or HSE6 were used．Lanes 2 to 3，the labeled fragments HSE1-5 were incubated with increasing amounts of the purified HsfA2 protein（5 μg and 10 μg，respectively）．Lanes 5 to 6，the labeled fragments HSE6 were incubated with increasing amounts of the purified HsfA2 protein（5 μg and 10 μg，respectively）．The arrow points to the specific HsfA2：：DNA complexes mentioned in the text．

2.3　凝胶阻滞分析结果

热激蛋白基因的转录活性依赖于热激因子 HSF 与高度保守的热激元件 HSE 的相互作用。番茄 HsfA2 蛋白是典型的热诱导蛋白，被认为是番茄热激应答的主要调节因子（Port 等，2004）。为了检测 *LeMTshsp* 启动子中预测的 HSE 是否具有 HSF 结合活性，分别扩增包含 HSE1-5 的启动子片段及包含远端 HSE6 的片段用于凝胶阻滞分析。

如图 3 所示，HsfA2-His6 融合蛋白可与 *LeMTshsp* 启动子的 HSE 元件在体外特异结合，形成 DNA-蛋白质复合物。而且，随着 HsfA2 蛋白量的增加，检测到的 DNA-蛋白复合体的量也逐步增加（图 3，泳道 2 - 3，5 - 6）。这种 HsfA2 的结合活性能被 100 倍过量的竞争物（未标记的 HSE1 - 5 启动子片段或 HSE6 启动子片段）所抑制（图 3，泳道 1 和 4），表明热激转录因子 HsfA2 和 *LeMTshsp* 启动子 HSE 元件的结合是特异的。并且 TATA-box 近端 HSE1-5 比远端 HSE6 结合活性强。

2.4　转 *LeMTshsp*：：GUS 融合基因植株的获得及分子鉴定

为了检测 *LeMTshsp* 启动子的活性，构建了 *LeMTshsp*：：GUS 载体（图 4），利用农杆菌介导法转化番茄，获得了 12 个具有卡那霉素抗性的转化株系。提取叶片基因组 DNA，用 GUS 基因特异性引物进行 PCR 分析，转基因植株均能扩增出 864 bp 的特异性产物，而非转化植株没有扩增出条带（图 5）。结果表明 GUS 基因已经整合在转基因植株基因组中。

2.5　热激、低温、外源 ABA 及重金属胁迫条件下 GUS 基因的表达

为了检测逆境条件下 *LeMTshsp* 启动子的活性，我们对热激、低温、外源 ABA 及重金属胁迫条件下转基因番茄叶片与根中的 GUS 表达进行了测定。如图 6 所示，常温下未经处理的转基因番茄叶片未检测到信号，根中除了分生组织区

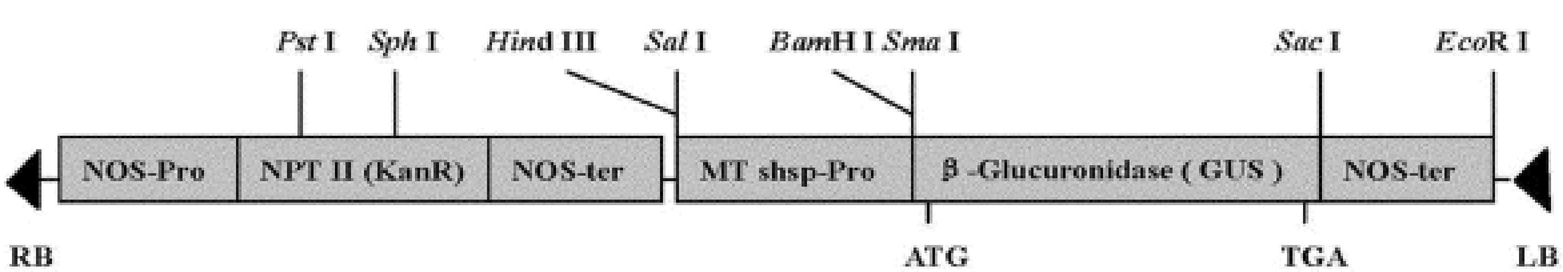


图 4　植物表达载体 *LeMTshsp*：：GUS 结构示意图

Fig．4　Diagram of the plant expression vector *LeMTshsp*：：GUS

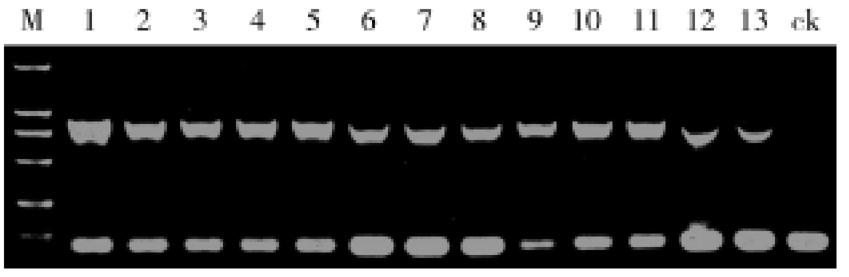


图5 转基因番茄植株的 PCR 分析

M . DL2000 DNA marker; 1 . 质粒阳性对照; 2～13 . 转基因植株; ck . 未转基因的阴性对照植株。

Fig . 5 PCR analysis of transgenic tomato plants

M . DL2000 DNA marker; 1 . Positive control, plasmid; 2 - 13 . Transgenic tomato plants; ck . Negative control, untransformed tomato plant .

外也未检测到蓝色。39℃热激条件下, 叶片及根中 GUS 染色非常强, 与常温下 pBI121 转基因植株 (*CaMV35S* 启动子驱动 GUS 表达) 接近; 2℃低温处理条件下叶片及根中均能检测到明显的 GUS 活性; 0.10 mmol/L的 ABA 处理条件下的检测到较弱的 GUS 信号; 转基因番茄经 Cd^{2+}、Cu^{2+}、Pb^{2+}、Zn^{2+} 常温条件下处理后, 均能检测到明显的 GUS 表达。

以上结果表明: *LeMTshsp* 启动子是典型的受热激、低温、外源 ABA 及重金属胁迫条件引发的诱导型启动子。

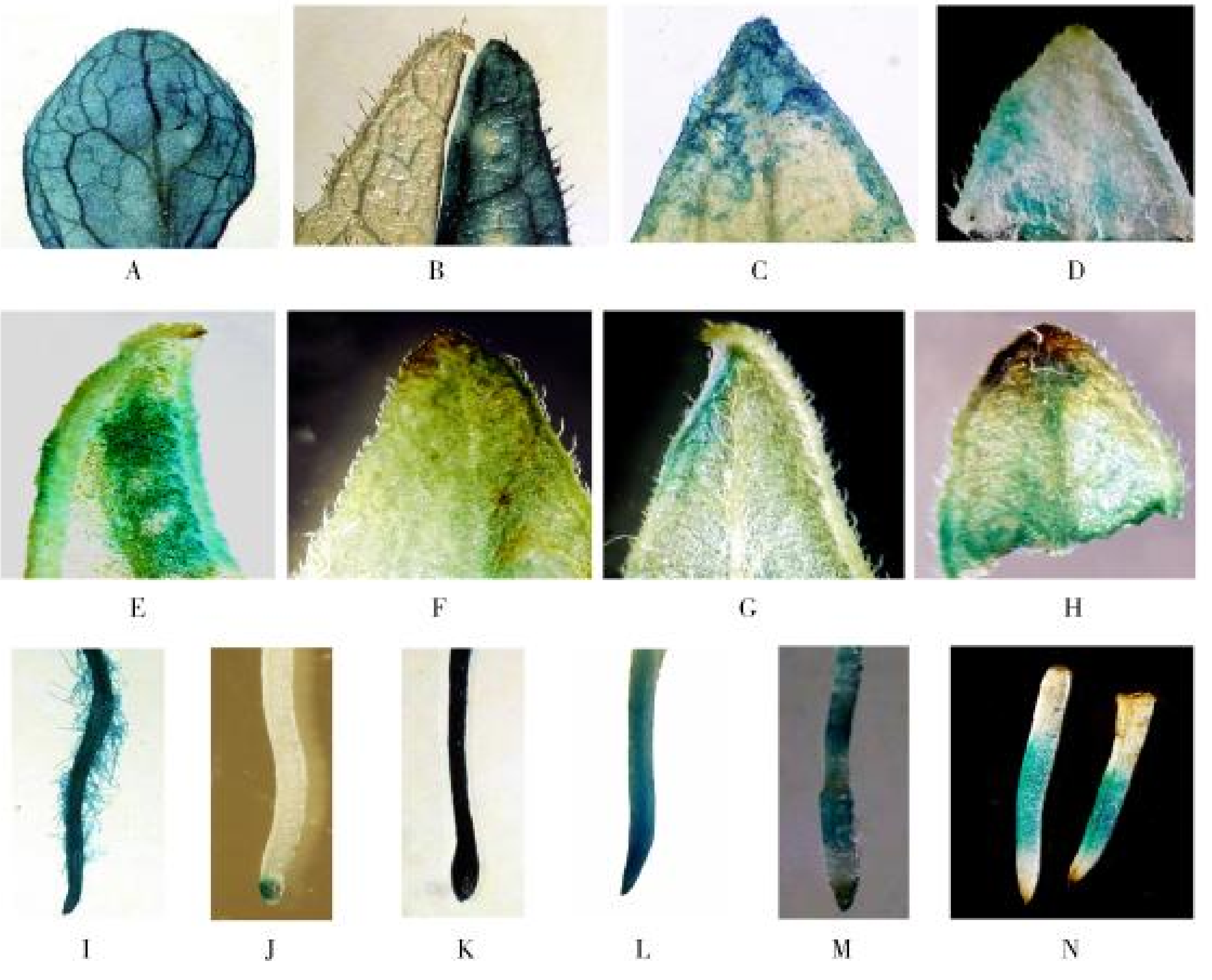


图6 各种胁迫下转基因番茄叶片及幼根 GUS 组织化学染色结果

A . pBI121 转基因植株常温下的叶片 GUS 染色结果; B-H, 各种处理条件下, *LeMTshsp*:: GUS 转基因番茄叶片 GUS 染色结果: B . 常温及39℃热激 3 h 的转基因番茄叶片; C . 2℃低温处理 48 h 的转基因番茄叶片; D . 0.10 mmol/L的 ABA 处理后 6 h 的转基因番茄叶片; E-H . 分别为 Cd^{2+} (E)、Cu^{2+} (F)、Pb^{2+} (G) 及 Zn^{2+} (H) 处理的转基因番茄叶片。I . pBI121 转基因植株常温下的幼根 GUS 染色结果; J-N . 各种处理条件下, *LeMTshsp*:: GUS 转基因番茄幼根 GUS 染色结果: J . 常温下转基因番茄幼根; K . 39℃热激 3 h 的转基因番茄幼根; L . 2℃低温处理 48 h 的转基因番茄幼根; M . 0.10 mmol/L ABA 处理的转基因番茄幼根; N . 0.20 mmol/L Pb^{2+} 处理的转基因番茄幼根。

Fig . 6 GUS staining in transgenic tomato leaves and roots after various stress treatments

A . GUS activity in pBI121 transgenic tomato leaves at normal temperature . B-H . GUS activity in *LeMTshsp*:: GUS transgenic tomato leaves after various stress treatments: B . Leaves at normal temperature or heated at 39℃ for 3 h; C . Leaves treated at 2℃ for 48 h; D . Leaves treated at 0.10 mmol/L ABA for 6 h; E-H . Leaves treated by Cd^{2+} (E), Cu^{2+} (F), Pb^{2+} (G) or Zn^{2+} (H) respectively . I . GUS activity in pBI121 transgenic tomato roots at normal temperature . J-N . GUS activity in *LeMTshsp*:: GUS transgenic tomato roots after various stress treatments: J . Roots at normal temperature; K . Roots heated at 39℃ for 3 h; L . Roots treated at 2℃ for 48 h; M . Roots treated by 0.10 mmol/L ABA; N . Roots treated by 0.20 mmol/L Pb^{2+} .

3　讨论

热激蛋白表达调控主要存在于转录水平(Wu，1995)。热激蛋白基因的转录活性依赖于热激因子 HSF 与高度保守的热激元件 HSE 的相互作用，HSE 是 5′-nGAAn-3′五核苷酸核心重复(Amin，1988)。HSF 与 HSE 的稳定结合至少需要两个五核苷酸核心重复，单个 nGAAn 无法稳定的结合 HSF。本研究获得了番茄 *LeMTshsp* 起始密码子上游 1915 bp 的调控序列，包括了起始密码子上游的 5′UTR 区，PlantCARE 及 TRANSFAC 分析表明该序列除了具有保守的 TATA box 及 CAAT box 外，还具有 6 组典型的 HSE 元件，其中 5 组位于 TATA box 近端（-128 bp 至 -222 bp)，另外 1 组位于 TATA box 远端，凝胶阻滞结果表明，HsfA2 蛋白与预测的 HSE 元件均具有结合活性，且近端 HSE1-5 比远端 HSE6 结合活性强。在许多大豆热激蛋白启动子区都发现了 AT-rich 区（Raschke 等，1988)，研究表明，在 *Gm-Hspl*7.3-*B* 基因上游的 AT-rich 区（-81 bp 至 -306 bp）具有类似增强子的功能（Baumann 等，1987)。*LeMTshsp* 启动子具有多个 AT-rich 区（-1915 bp 至 -280 bp)，这些 AT-rich 区可能对该基因的表达具有增强作用。

Liu and Shono（2001）对热处理的番茄叶片进行 Northern 杂交结果表明，*LeMTshsp* 是番茄 4 类小分子热激蛋白基因中表达最强的基因；另外，Sabehat 等（1996）研究发现，在热激后的番茄绿果中累积大量的线粒体 sHSP。本文作者将克隆的 *LeMTshsp* 启动子与 GUS 基因融合导入番茄，热激处理条件下 GUS 检测结果表明，该启动子为热诱导强启动子，其活性与 *CaMV*35*S* 启动子类似。许多热激蛋白在低温（Neven 等，1992；Krishna 等，1995；Sabehat 等，1998）条件下有表达，Liu and Shono（2001）的研究表明，*LeMTshsp* 在 6℃冷处理下就具有表达，在 2℃时表达更强，本研究中，在 2℃处理条件下检测到明显的 GUS 活性。另外，ABA（Singla and Grover，1993；Coca 等，1996）及重金属（Wollgiehn and Neumann，1999）也能诱导部分热激蛋白表达，本研究中，在外源 ABA 及重金属胁迫条件下都检测到明显的 GUS 活性。以往的研究结果表明，*HaHsp*17.7*G*4 启动子对 ABA 的应答是通过 HSF3 实现的（Rojas 等，1999)。许多资料表明 AP-1 结合元件与 Cd 等重金属胁迫有关(Alam，1994)，但是在酵母细胞中，Cu 诱导的 CUP1 铜金属硫蛋白基因的活化是通过该基因启动子区的 HSE 元件起作用的（Peña 等，1998)。而且，*hsp*70 被热激和重金属 Cd 的超活化作用是通过 HSF 依赖的方式实现的（Saydam 等，2003)。是热激元件 HSE 还是预测的胁迫相关元件（如冷反应元件 C-repeat_DRE，ABA 反应元件 ABRE，activating protein 1 [AP-1]）在 *LeMTshsp* 启动子的低温、外源 ABA 及重金属胁迫应答过程中扮演更重要角色有待于进一步的研究。

已经发现，不少抗性基因（如脯氨酸合成酶系、活性氧清除酶系、渗调物合成酶系，以及热激蛋白等）可以在多种逆境下提高植物的抗性。如果将受热激、低温、外源 ABA 及重金属胁迫条件诱导的 *LeMTshsp* 启动子与此类多功能抗性基因融合，应用于植物基因工程，即可避免导入基因的组成型表达，防止无谓的能量浪费，不影响植物的正常生长发育，充分有效的发挥上述基因的功能，从而更有效的提高植物抵抗多种逆境的能力。

〔参　考　文　献〕

Alam J，1994. Multiple elements within the 5′ distal enhancer of the mouse heme oxygenase-1 gene mediate induction by heavy metals [J]. *J Biol Chem*，**269** (40)：25049—25056

Amin J，Ananthan J，Voellmy R，1988. Key features of heat-shock regulatory elements [J]. *Mol Cell Biol*，**8** (9)：3761—3769

Baumann G，Raschke E，Bevan M *et al*. 1987. Functional analysis of sequences required for transcriptional activation of a soybean heat shock gene in transgenic tobacco plants [J]. *EMBO J*，**6** (5)：1161—1166

Coca MA，Almoguera C，Thomas TL *et al*. 1996. Differential regulation of small heat-shock genes in plants：analysis of a water-stress-inducible and developmentally activated sunflower promoter [J]. *Plant Mol Biol*，**31** (4)：863—876

Dellaporta SL，Wood J，Hicks JB，1983. A plant DNA minipreparation：version II [J]. *Plant Mol Biol Rep*，**1** (4)：19—21

Holsters M，de Waele D，Depicker A，1978. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Mol Gen Genet*，**163** (2)：181—187

Huang N，Wu L，Nandi S *et al*. 2001. The tissue-specific activity of a rice beta-glucanase promoter (Gns9) is used to select rice transfor-

mants [J]. *Plant Sci*, **161** (3): 589—595

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW, 1987. GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. *EMBO J*, **6** (13): 3901—3907

Kasuga M, Liu Q, Miura S *et al*. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor [J]. *Nat Biotechnol*, **17** (3): 287—291

Krishna P, Sacco M, Cherutti JF *et al*. 1995. Cold-induced accumulation of hsp90 transcripts in *Brassica napus* [J]. *Plant Physiol*, **107** (3): 915—923

Li YK (李一琨), Wang JF (王金发), 1998. Advances of the studies on plant promoter [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), **15** (suppl): 1—6

Liu J, Shono M, 2001. Molecular cloning the gene of small heat shock protein in the mitochomdria and endoplasmic reticulum of tomato [J]. *Acta Bot Sin*, **43** (2): 138—145

Mosser DD, Theodorakis NG, Morimoto RI, 1988. Coordinate changes in heat shock element binding activity and HSP70 gene transcription rates in human cells [J]. *Mol Cell Biol*, **8** (11): 4736—4744

Neven LG, Haskell DW, Guy CL *et al*. 1992. Association of 70-kilodalton heat-shock cognate proteins with acclimation to cold [J]. *Plant Physiol*, **99** (4): 1362—1369

Peña MM, Koch KA, Thiele DJ, 1998. Dynamic regulation of copper uptake and detoxification genes in saccharomyces cerevisiae [J]. *Mol Cell Bio*, **18** (5): 2514—2523

Port M, Tripp J, Zielinski D *et al*. 2004. Role of Hsp17.4-CII as coregulator and cytoplasmic retention factor of tomato heat stress transcription factor HsfA2 [J]. *Plant Physiol*, **135** (3): 1457—1470

Raschke E, Baumann G, Schoffl F, 1988. Nucleotide sequence analysis of soybean small heat shock protein genes belonging to two different multigene families [J]. *J Mol Biol*, **199** (4): 549—557

Rojas A, Almojuera C, Jordano J, 1999. Transcriptional activation of a heat shock gene promoter in sunflower embryos: synergism between ABI3 and heat shock factors [J]. *Plant J*, **20** (5): 601—610

Sabehat A, Lurie S, Weiss D, 1998. Expression of small heat-shock proteins at low temperatures. A possible role in protecting against chilling injuries [J]. *Plant Physiol*, **117** (2): 651—658

Sabehat A, Weiss D, Lurie S, 1996. The correlation between heat-shock protein accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruit [J]. *Plant Physiol*, **110** (2): 531—547

Saydam N, Steiner F, Georgiev O *et al*. 2003. Heat and heavy metal stress synergize to mediate transcriptional hyperactivation by metal-responsive transcription factor MTF-1 [J]. *J Biol Chem*, **278** (34): 31879—31883

Singla SL, Grover A, 1993. Antibodies raised against yeast HSP104 cross-react with a heat- and abscisic acid-regulated polypeptide in rice [J]. *Plant Mol Biol*, **22** (6): 1177—1180

Wollgiehn R, Neumann D, 1999. Metal stress response and tolerance of cultured cells from *Silene vulgaris* and *Lycopersicon peruvianum*: role of heat stress proteins [J]. *J Plant Physiol*, **154** (4): 547—553

Wu C, 1995. Heat shock transcription factors: structure and regulation [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **11**: 441—469